

Aus der Abteilung für klinische Immunologie und
Asthma-Poliklinik der Freien Universität Berlin
(wissenschaftliche Einrichtung 15, Fachbereich 3)
Leitender Arzt: Professor Dr. med. Gert Kunkel

**ÜBER DEN HISTAMINGEHALT
IN ALLERGENTESTLÖSUNGEN
AM BEISPIEL
VON TIEREPITHELEXTRAKTEN**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Susanna Lübcke
aus Berlin

1405

Aus der Abteilung für klinische Immunologie und
Asthma-Poliklinik der Freien Universität Berlin
(wissenschaftliche Einrichtung 15, Fachbereich 3)

Leitender Arzt: Professor Dr. med. Gert Kunkel

ÜBER DEN HISTAMINGEHALT
IN ALLERGENTESTLÖSUNGEN
AM BEISPIEL
VON TIEREPITHELEXTRAKTEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Susanna Lübcke
aus Berlin

Referent: Prof.Dr.G.Kunkel

Korreferent: Prof.Dr.F.Klaschka

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 20.02.85

Über den Histamingehalt in Allergentestlösungen am Beispiel von Tierepithelextrakten

Seite

I.	Aufgabenstellung	1
II.	Bereits vorliegende Untersuchungen	2
III.	Methoden und Material	5
1.	Reaktionsablauf	7
2.	Geräte und Reaktionslösungen	8
3.	Linearer Meßbereich	11
4.	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	11
5.	Genauigkeit	11
6.	Untersuchungsmaterial	14
7.	Spezifität der Methode	18
IV.	Ergebnisse	20
1.	Gemessene Fluoreszenzwerte in den Testlösungen	20
2.	I.-C.- und Prick-Histamin-Titration an freiwilligen Probanden	23
3.	Gemessener Histamin-Gehalt der I.C.-Kontroll- Lösungen	27
4.	Gemessener Histamin-Gehalt der Prick- Kontroll-Lösungen	29
V.	Diskussion der Ergebnisse	31
1.	Vergleichbarkeit von Allergenextrakten	31
2.	Mindestgehalt von Histamin in Histamin- Kontroll-Lösungen	34
3.	Die Möglichkeit von falsch positiven Haut- testreaktionen	36
VI.	Zusammenfassung	41
VII.	Literatur	42



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Aufgabenstellung

In der Diagnostik von Typ-I-Allergien werden neben den aufwendigen in-vitro-Methoden wie RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test) und Histamin-Release in erster Linie Hauttests wie Prick- und Intracutantest (I.C.-Test) routinemäßig angewendet. Zur Durchführung dieser Hauttests bietet die Industrie fertige Allergen-Testlösungen an. Da in der klinischen Praxis häufiger falsch positive Reaktionen auf diese Testlösungen beobachtet werden können, ergibt sich die Frage, wie diese Befunde zu interpretieren sind.

Eine von vielen möglichen Erklärungen für falsch positive Reaktionen kann durch Verunreinigungen der Testlösungen gegeben sein. Die wichtigste Verunreinigung stellt dabei ohne Zweifel Histamin dar, da dieses biogene Amin fast in allen natürlichen Allergenen, wie z.B. Pollen, Tierepithelien etc. enthalten ist. Nur bei adäquater Aufbereitung des Nativmaterials ist mit Histamin-Freiheit zu rechnen. Die Qualität der vielen auf dem Markt erhältlichen Extrakte weist vermutlich erhebliche Unterschiede in dieser Beziehung auf.

Deshalb sollte die Frage an einer Auswahl bestimmter Allergenlösungen untersucht werden.

Als Untersuchungsmaterial wurden Tierepithelien gewählt:

Prick- und I.C.-Testlösungen für Hund, Katze, Kaninchen, Goldhamster, Meerschweinchen, Pferd, Ratte und Maus von sechs verschiedenen Herstellern.

Zusätzlich wurden die Histamin-Kontrollen dieser Hersteller auf ihren tatsächlichen Histamingehalt überprüft.

II. Bereits vorliegende Untersuchungen

Die Angaben in der Literatur über den Histamingehalt in Tierepithel-Testlösungen sind äußerst spärlich, zwar finden sich eine größere Anzahl von Arbeiten über die Reinheit (Purification) der Extrakte (1,8), die jedoch spezielle Angaben über den Gehalt von Histamin in Tierepithelextrakten vermissen lassen.

AAS veröffentlichte eine Reihe von Arbeiten zu diesem Thema. In seinen allgemeinen Betrachtungen über Allergenextrakte (3) z.B., bemängelt er die Qualität der Allergenextrakte, deren Ausgangsmaterial schlecht definiert sei, die unbekannte Mengen von irritierenden Bestandteilen enthielten und deren Deklaration auf den Extraktflaschen oft irreführend oder sinnlos sei. Unter den irritierenden Bestandteilen versteht er zum einen niedermolekulare Irritantien, zum anderen hochmolekulare Endotoxine. Eine seiner wichtigsten Forderungen an die moderne Allergenherstellung ist die Entfernung dieser Substanzen. In einer anderen Arbeit (1) über die Reinheit der Allergenextrakte spricht er direkt von freiem Histamin, Endotoxinen und Substanzen, die Histamin oder andere Mediatoren freisetzen können, die in einigen der Allergenextrakte gefunden werden konnten.

Eine im Januar dieses Jahres erscheinende Arbeit von HAMMOND und ROOKE (18) beschäftigt sich mit dem Problem von unspezifischen Hautreaktionen auf Allergenextrakte. Es wurden 214 Dose Glycerin-Extrakte, darunter 28 Tierepithelien, untersucht. Mit der angewendeten Methode, dem Intradermalen Empfindlichkeitstest am Meerschweinchen, konnte nur einer dieser Extrakte, eine Federnmischung, als hautreizend im Sinne einer positiven Hautreaktion bewertet werden. Die anderen 213 Lösungen sind als frei von Reizstoffen, zu denen das Histamin gehören würde, zu betrachten.

Einige wenige Autoren haben den Histamingehalt in einzelnen Testextrakten untersucht: so konnten GUERIN und TIOULONG (15) 0.1 µg/ml Histamin in einem Hausstaubextrakt feststellen. Sie gingen dabei nach der Methode von MAGNUS (1904) vor, die auf dem Nachweis von Histamin aufgrund der Kontraktion von Meerschweinchendarm beruht. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Hausstaub-Verdünnungen untersucht, wobei als Allergenausgangsextrakt "House dust" : "Delayed absorption" extract, absorbed on to aluminium hydroxide, containing merthiolate 0.1 g/litre-Batch 33 - verwendet wurde.

FISCHER und SCHMUTZLER (12) untersuchten verschiedene Allergenextrakte auf ihren Histamingehalt mit Hilfe der radioenzymatischen Doppelisotopenmethode von BEAVEN et al. Die gemessenen Werte können der Tabelle 1 entnommen werden.

TABELLE 1

Histamingehalt der verwendeten Allergenextrakte:

Allergenextrakt	Charge	Histamingehalt ng/ml
<u>Pollen:</u>		
Roggen	Lot 3518	250
Roggen	Lot 92210	240
Roggen	Lot 77M02/14-1	380
Löwenzahn	Lot 53230	0
Linde	Lot 520105	0
<u>Pilze:</u>		
Alternaria tenuis	Lot '0106 1979	60
Botrytis cinerea	Lot 832361/222	0
<u>Hausstaub:</u>		
Hausstaub/D.pteronis.	Lot 2107	43
<u>Biene:</u>		
Ganzkörper	Lot 130379	180
Reless ^R -Bienengift	Lot EI 14286	100
Bienengift (lyophilis.)	UCL Vernon, London	2,5 µg/ml

KLEINE-TEBBE wies Histamin in *Trogoderma angustorum*-Extrakten nach (24) und schon seit längerem bekannt sind der Histamingehalt in Roggenpollen (42) und Bienengift (17).

Daß diesem Problem auch von Seiten der Gesundheitsbehörden nicht allzu große Bedeutung beigemessen wird, geht aus der Tatsache hervor, daß das Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt für Sera und Impfstoffe) vor Zulassung eines Allergenextraktes keine Histaminbestimmung durchführt. Für das Institut "liegt dafür keine Notwendigkeit vor, da - auch in Extrakten aus Tierepithelien - aufgrund der vorzunehmenden Verdünnungen des Extraktes kein Histamin - wenn überhaupt welches vorhanden wäre - mehr nachweisbar wäre." (37)

III. Methoden und Material

Zur Messung des Histamingehaltes der Testlösungen wurde ein Autoanalyser der Firma TECHNICON benutzt. Histamin wird hierbei fluorometrisch nach SHORE (36) bestimmt. Die Automatisierung der Methode wurde von SIRAGANIAN (38) eingeführt.

Die Methode basiert auf der Kopplung von Histamin mit o-Phthalaldehyd zu einem fluoreszierenden Komplex im hoch alkalischen Milieu. Stabil ist dieser allerdings im sauren pH-Bereich.

Um andere störende Komponenten zu beseitigen wird das Histamin extrahiert, bevor es kondensiert wird. Eventuell vorhandenes Protein wird aus den Proben mit Perchlorsäure gefällt und dann wird Histamin in n-Butanol extrahiert. Zurück in eine wässrige Phase wird Histamin durch verdünnte Salzsäure und Heptan gebracht. Im stark alkalischen Milieu wird Histamin an o-Phthalaldehyd gebunden und die Probe wird im sauren Bereich konserviert und der Messung zugeführt. Diese Mehrfach-Extraktion ist notwendig, um Histidin und andere störende Komponenten vor dem Kondensations-schritt zu entfernen. (38)

Das Fließschema (Abb.1) zeigt den Aufbau der Analytischen Einheit. Die Farbe der benutzten Schläuche unter der Druckpumpe gibt ihren Durchmesser in inches (1 inch = 3.3 cm) an. Aus der Größe des Durchmessers ergibt sich die Menge Flüssigkeit, die pro Minute angesaugt wird.

Abfall

FLIEßSCHEMA HISTAMINBESTIMMUNG¹

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

Reaktionsablauf

Die zu untersuchende Probe wird durch den Probennehmer angesaugt und als erstes mit 5 %iger Natronlauge (NaOH) versetzt. Die ebenfalls zugeführte Luft dient der besseren Durchmischung. Nach Zusatz von n-Butanol wird die Probe mit 0.5 N NaOH alkalisiert. Der Extraktor I trennt die wässrige Phase, die verworfen wird, von der alkoholischen, die erneut über die Pumpe dem System zugeführt wird.

Es werden 0.1 N Salzsäure (HCl) und Heptan zugesetzt und wiederum nach Durchmischen werden im Extraktor II die Phasen getrennt. Jetzt wird die alkoholische Phase verworfen, die wässrige Phase wird über die Pumpe zurückgeführt und mit Luft segmentiert. Nach der erneuten Alkalisierung mit 1 N NaOH wird das ortho-Phthalaldehyd (OPT) zugesetzt und diese Proben-OPT-Lösung wird längere Zeit gemischt, damit das Histamin an das o-Phthalaldehyd gebunden werden kann.

Um diese Reaktion zu beenden und den Komplex zu stabilisieren wird Phosphorsäure (H_3PO_4) zugegeben. In dieser stabilen Bindung wird das Histamin dem Fluorometer zur Messung zugeführt.

Geräte und Reaktionslösungen

Für die Durchführung der Messung sind folgende Geräte und Reaktionslösungen notwendig:

° Probennehmer (sampler)

Für den Probennehmer wurde die 30-2/1 Zeitscheibe gewählt, d.h. es wurde mit einer Probenfrequenz von 30 Proben pro Stunde gearbeitet.

° Proportionierungspumpe (proportioning pump)

Für die Analytische Einheit sind die Schlauchdurchmesser und damit die gezogenen ml pro Minute dem vorangegangenen Fließschema zu entnehmen. Mit dem benutzten Schlauch für die Probe wurde ein Mindestprobenvolumen von 0.8 ml benötigt.

° Fluorometer (fluoronephelometer)

Die Einstellungen am Fluorometer waren folgende:

Sample Aperture:	5
Reference Aperture:	1
Standard Calibration:	710
Baseline:	410
no damping	
Filter: Primär	355 nm
Secundär	460 nm

° Schreiber (recorder)

Die Schreiberempfindlichkeit war auf 50 mV eingestellt, der Papiervorschub auf 30 cm pro Stunde.

Alle verwendeten Geräte gehören zum System:
TECHNICON Autoanalyzer II

Lösungen.

5 %ige NaCl-Lösung

hergestellt aus Natriumchlorid krist.
pro analysi MERCK Art. 6404

5 N NaOH

1 N NaOH hergestellt aus
Natriumhydroxid Plätzchen reinst
MERCK Art. 6482

0.1 N HCl hergestellt aus

Salzsäure min. 32 % (etwa 1.16) pro analysi
MERCK Art. 319

2.2 M H_3PO_4 hergestellt durch Verdünnung aus
ortho-Phosphorsäure min. 85 % (etwa 1.71)
reinst MERCK Art. 563

n-Butanol: n-Butanol pro analysi
MERCK Art. 1990

n-Heptan zur Analyse MERCK Art. 4379

Methanol zur Analyse MERCK Art. 6009

Borsäure krist. zur Analyse MERCK Art. 165

o-Phthaldialdehyd No P-1378 von SIGMA, LOT 13 F-0715

OPT-Reagenz:

- ° 0.5 M Borat-Puffer (pH 12.3)
30.95 g Borsäure in 900 ml aqua dest. auflösen,
pH-Wert mit 50 %iger NaOH einstellen, auffüllen
auf 1000 ml.
- ° 40 mg o-Phthaldialdehyd in 2 ml Methanol lösen,
mit Boratpuffer auf 100 ml auffüllen.

Meßkolben durch Alu-Folie vor Lichteinwirkung
schützen und OPT-Reagenz während der Messung
im Eisbad kühlen.

Standard:

165.6 mg Histamindihydrochlorid werden in 100 ml 0.1 N HCl gelöst. Die Stocklösung wurde zu je 1 ml in Eppendorfcups gefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Für jeden Tag der Messung wurde eine neue Lösung aufgetaut und daraus der Histamin-Standard hergestellt. Hierzu wurden 0.1 ml der Stocklösung mit 9.9 ml 0.4 N PClO_4 versetzt, so daß eine Histaminkonzentration von 10 ng/ml vorlag.

Perchlorsäure (PClO_4) für die Proben:

Da aus den Proben das Protein durch Fällung mit PClO_4 entfernt werden sollte, wurde eine PClO_4 -Verdünnungsreihe angesetzt:

Es wurde mit PClO_4 in verschiedenen Normalitäten (0.4 N, 0.8 N, 2 N, 4 N) das Protein aus einer Katzen-Prick-Lösung gefällt. Die Lösung wurde zentrifugiert und der Überstand gemessen. Die Meßergebnisse mit 4 N PClO_4 konnten nicht verwertet werden, da sie unmeßbar hoch waren. Es ist anzunehmen, daß der Puffer des Systems eine 4 N PClO_4 nicht mehr neutralisieren kann.

Da die Kurven bei Fällung mit 2 N PClO_4 und 0.8 N PClO_4 identisch waren, wurde davon ausgegangen, daß eine 0.8 N PClO_4 eine vollständige Proteinfällung bewirkt und es wurde mit

0.4 N PClO_4 als Verdünnungslösung und
0.8 N PClO_4 als Fällungslösung
gearbeitet.

Eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure ergab eine unleserliche Schreiberkurve, so daß aus methodischen Gründen auf diese Fällungsart verzichtet werden mußte.

Linearer Meßbereich

1 ng - 10 ng / ml Histamin

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Standard-Verdünnungsreihe wurde vierwöchentlich wiederholt und ergab dabei sehr gut reproduzierbare Werte, so daß die Einzelmessungen als gut reproduzierbar gelten können.

Genauigkeit

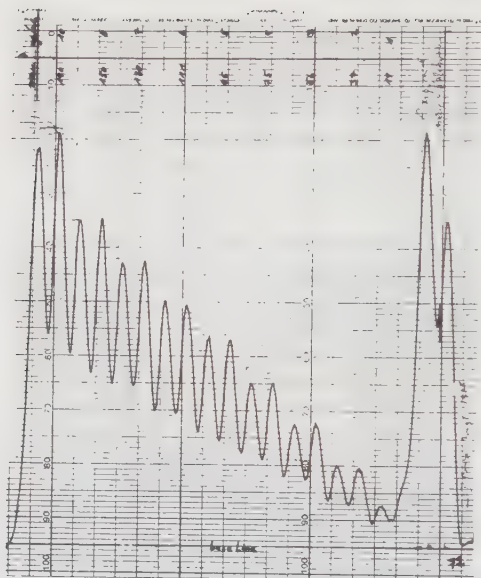
Um die Genauigkeit der Methode festzustellen, wurde eine Verdünnungsreihe mit Histamin hergestellt. Hierzu wurden Lösungen mit Histaminkonzentrationen von 1,2,3,4,5,6,7,8 und 10 ng Histamin/ml hergestellt und im Fluorometer gemessen. Die Ergebnisse und Umrechnungen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Die Original-Meßkurve und die sich daraus ergebene Eichkurve sind umseitig abgebildet.

Als Standard und damit Berechnungsgrundlage diene der Mittelwert der beiden Ausschläge für 10 ng/ml Histamin.

Berechnung der Einzelwerte:

$$x = \frac{10 \text{ Meßwert in cm}}{18.7 \text{ cm}}$$



T A B E L L E 2

Verdünnungsreihe Histamin - Standard

<u>eingesetzt</u> <u>ng/ml</u>	<u>gemessen</u> <u>cm</u>	<u>berechnet</u> <u>ng/ml</u>	<u>Differenz</u> <u>ng/ml</u>
1	1.9	1.01	- 0.01
2	3.7	1.98	- 0.02
3	5.6	2.99	- 0.01
4	7.5	4.09	+ 0.09
5	9.5	5.08	+ 0.08
6	11.1	5.94	- 0.06
7	13.0	6.95	- 0.05
8	15.0	8.02	+ 0.02
10	18.4		
10	19.0		

Da die Abweichung eines gemessenen Wertes von dem des eingesetzten nie mehr als 0.09 ng (ca. 1 %) betrug, kann die Methode als hinreichend genau betrachtet werden und die Meßergebnisse können bis auf 1 ng/ml genau angegeben werden.

Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden die Prick- und I.C.-Testlösungen von folgenden Tierepithelien:

Hund
Katze
Kaninchen
Goldhamster
Meerschweinchen
Pferd
Ratte
Maus .

Dabei wurden folgende Hersteller berücksichtigt:

Dome Hollister Stier / Tropon-Werke, Köln
DIEPHUIS a.m.b. maser g.m.b.h., Herne
Allergopharma, Joachim Ganzer KG, Reinbeck bei Hamburg
HAL Allergie GmbH, Düsseldorf
Bencard-Beecham, Joachim A. Wulfig, Neuss
Basotherm G.m.b.H., Biberach an der Riss

Von den insgesamt sechs Herstellern wurden acht Allergenextrakte untersucht, so daß insgesamt 48 Einzelallergene überprüft wurden. Für die I.C.-Testlösungen waren alle Allergene vorhanden, für die Prick-Testlösungen fehlten: Hund von Diephuis und Ratte und Maus von Basotherm. Es wurden also 93 Testlösungen auf ihren eventuellen Histamingehalt überprüft.

Die I.C.-Lösungen waren alle farblos, die Prick-Lösungen teilweise farblos, teilweise wiesen sie jedoch stärkere Farbgehalte auf. Die Farben sowie die Allergen-Inhaltsangaben der Hersteller und die enthaltenen Konservierungstoffe sind den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen.

Es sei schon hier darauf hingewiesen, daß so ziemlich jeder Hersteller eine andere Einheit für die Inhaltsangabe seiner Allergenextrakte wählt. Keine der Einheiten gibt jedoch eine Auskunft über die Stärke des Allergens oder die Verarbeitung des Rohmaterials, z.B. Extraktionsverfahren. Weitere Überlegungen hierzu vergl. Kapitel "Vergleichbarkeit der Allergenextrakte."

I.C. - Testlösungen
- Inhaltsangaben laut Hersteller -

Hersteller	Hund	Katze	Kaninchen	Meerschwein	Goldhamster	Pferd	Ratte	Maus	Konservierungsstoff
Hallister- Stier Tropon	1:100 G/V	1:100 G/V	1000 PNU/ml	1:100 G/V	1000 PNU/ml	1000 PNU/ml	1000 PNU/ml	1000 PNU/ml	0,4 % Phenol
Diephuis Maser	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml	0,05 mg/ml	0,5 % Phenol
Allergo- pharma	1+999	1+999	1+999	1+999	1+999	1+999	1+999	1+999	0,4 % Phenol
HAL	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,5 % Phenol
Benoard Beecham	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 % Phenol
Basotherm	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,4 % Phenol

TABELLE 4

PRICK - Testlösungen

- Inhaltsangaben laut Hersteller -

Hersteller	Hund	Katze	Kaninchen	Menschwein	Goldhamster	Pferd	Ratte	Maus	Konservierungsstoff
Hollister-Stier Trojan	1:10 G/V	1:10 G/V	1:10 G/V	1:10 G/V	1:10 G/V goldbraun	1:10 G/V	1:20 G/V gelb	1-10 G/V	50 % Glycerin, Phenol: keine Angabe
Diephuis Maser	5 mg/ml	5 mg/ml braun	5 mg/ml braun	5 mg/ml dunkelbraun	5 mg/ml braun	5 mg/ml braun	5 mg/ml hellgelb	5 mg/ml	Glycerin: keine Angabe 0,5 % Phenol
Allergo - pharma	5000 PNU/ml	5000 PNU/ml	5000 PNU/ml	5000 PNU/ml	5000 PNU/ml	5000 PNU/ml	1500 PNU/ml	1500 PNU/ml	50 % Glycerin 0,4 % Phenol
HAL	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	0,63 g/ml Glycerin 2,5 mg/ml Phenol
Bencard Beecham	150 % hellbraun	150 % dunkelbr.	150 % braun	6 %	6 %	150 % braun	6 %	6 %	Glycerin: keine Angabe 0,5 % Phenol
Basotherm	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %			50 % Glycerin 0,2 % Phenol

Die Lösungen ohne Farbangabe sind farblos.

Probenvorbereitung

Aus allen Proben wurde das Protein mit 0.8 N Perchlorsäure gefällt, indem jeweils 1 ml Testlösung mit 1 ml Perchlorsäure behandelt wurde, so daß eine Endkonzentration von 0.4 N Perchlorsäure vorlag. Die Proben wurden eine halbe Stunde im Kühlschrank aufbewahrt und dann bei 3000 G/min. in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert.

Der Überstand wurde in die Becherchen des Probennehmers gefüllt und dann gemessen. Für alle Proben erfolgten Doppelbestimmungen.

Ein sichtbarer Niederschlag war nur bei einigen Prick-Testlösungen, vor allem den farbigen, zu finden. In den I.C.-Lösungen fand sich kein Niederschlag.

Da sich das OPT außer an Histamin auch an Protein und andere Bestandteile - hierauf soll im Absatz "Spezifität" noch einmal eingegangen werden - bindet, war nicht vorherzusehen, in welcher Form die ebenfalls in den Lösungen enthaltenen Konservierungsstoffe die Messung stören würden.

Daher wurde von jeder Firma die Prick- bzw. I.C.-Leerwert-Kontrolle mitgemessen und vorher in der gleichen Art wie die Proben behandelt. Die Leerwert-Kontrollen zeigten keinen meßbaren Ausschlag, d.h. die enthaltenen Konservierungsstoffe bzw. das Glycerin in den Prick-Testlösungen störten die Messung nicht.

Die Histamin-Kontroll-Lösungen der Hersteller wurden mit 0.4 N Perchlorsäure verdünnt und zwar jeweils so weit, daß eine Endkonzentration von 10 ng Histamin / ml vorlag. Dies bedeutet z.B. für die Prick-Histamin-Kontrolle von HAL (1 % laut Etikett) eine Verdünnung von 1 : 1 000 000.

Nach Verdünnung wurden die Kontroll-Lösungen ebenso wie die anderen Proben vorbehandelt und gemessen.

Spezifität der Methode

Das OPT reagiert nicht streng spezifisch mit Histamin, sondern auch mit weiteren chemischen Verbindungen, insbesondere den Aminen. In der Untersuchung von SIRAGANIAN (38) waren es dabei vor allem das Spermidin und das Spermin, die die höchsten Fluoreszenzwerte ergaben.

SHELLEY und JUHLIN, die dieser Frage ebenfalls nachgegangen sind, haben über 60 Verbindungen, vor allem Aminosäuren und Peptide untersucht und nur bei Histidin und Glutathion positive Werte erhalten (35).

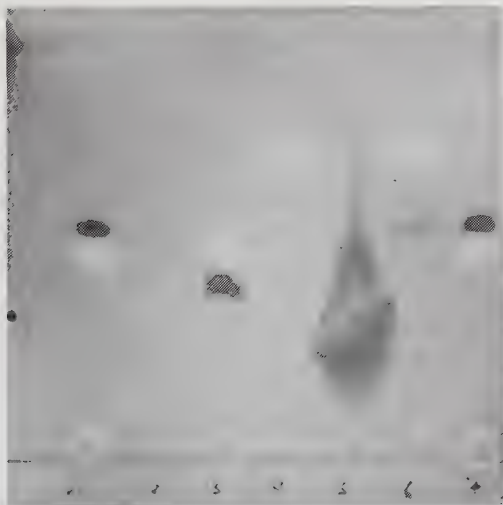
Alle diese Substanzen, die zwar mit OPT ebenso einen Komplex bilden wie das Histamin, müssen jedoch in höheren moralen Konzentrationen vorliegen, um eine vergleichbare Fluoreszenz zu erzeugen. Dennoch könnten sie die Meßergebnisse falsch positiv beeinträchtigen.

Und da z.B. das Glutathion - ebenso wie das Spermin - in den Zellen aller Lebewesen gefunden werden konnte (11), ist durchaus mit seinem Vorhandensein in Tierepithel-extrakten zu rechnen. Da die benutzte Methode also nicht streng genug spezifisch auf Histamin reagiert, wurden die Ergebnisse in "ng fluoreszierender Bestandteil / ml" angegeben. Nur ein qualitativer Nachweis, z.B. eine Dünnschichtchromatographie, könnte die gemessene Fluoreszenz als Histamin bestätigen.

Auch könnte eine Klärung dieser Frage mit anderen quantitativen Nachweismethoden, wie enzymatic single isotopic assay (16) oder ionisation Mass Spectrometry (21) erreicht werden, da sie genügend spezifisch sind, jedoch sind diese methodisch sehr aufwendig.

Um den qualitativen Nachweis zu erbringen, wurde nach der erst in diesem Jahr von WAHL et. al entwickelten Methode vorgegangen, die mit HPTLC-Fertigplatten (Kieselgel 60) arbeitet (44).

Diese Methode ist streng spezifisch für Histamin; das als Vergleich mitgelaufene Histidin zeigte einen deutlich verschiedenen R_F -Wert.*



Kieselplatte mit 7 Auftragspunkten

- Punkt 1 : Histamin 0,1 mg/ml. in NaCl 0,9 % gelöst
- Punkt 2 : Histamin 0,005 mg/ml in NaCl 0,9 % gelöst (Nachweisgrenze)
- Punkt 3 : Histidin 0,1 mg/ml in NaCl 0,9 % gelöst
- Punkt 4 : Perchlorsäure 0,4 N
- Punkt 5 : Tropon-Ratte Prick-Testlösung
1:1 mit 0,8 N Perchlorsäure
- Punkt 6 : Histamin 0,01 mg/ml in Perchlorsäure 0,4 N
- Punkt 7 : Histamin 0,1 mg/ml, in NaCl 0,9 % gelöst

Es wurden auf jeden Punkt 10 µl Flüssigkeit aufgetragen.

Leider konnte jedoch mit dieser sehr eleganten und schnellen Methode das Histamin in den Testlösungen nicht nachgewiesen werden, da die Methode zum einen nicht empfindlich genug ist - die Nachweisgrenze lag bei 5000 ng/ml - und zum anderen durch das enthaltene Glycerin gestört wurde. Die zur Proteinfällung eingesetzte Perchlorsäure bildete einen zusätzlichen Störfaktor, so daß der qualitative Nachweis nicht erbracht werden konnte.

* R_F -Wert : "Ratio of Fronts"

R_F -Wert = $\frac{\text{Entfernung Start - Substanzfleck (Mitte)}}{\text{Entfernung Start - Lösungsmittelfront}}$

IV. Ergebnisse

1. Gemessene Fluoreszenzwerte in den Testlösungen

Die Fluoreszenzwerte der gemessenen Prick- und I.C.-Testlösungen wurden in ng/ml umgerechnet und sind den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen.

In den I.C.-Testlösungen sind bei 5 der 6 untersuchten Hersteller keine fluoreszierenden Bestandteile meßbar. Nur die Lösungen der Firma Tropon zeigen eine schwache Fluoreszenz, wobei das Katzenallergen mit 60 ng/ml den deutlichsten Ausschlag ergab.

Ganz allgemein sind für die Prick-Testlösungen höhere Fluoreszenzwerte gefunden worden. Dies hängt nicht mit dem Gehalt an Glycerin zusammen, denn die Prick-Kontroll-Lösungen zeigten ja keine Fluoreszenz, sondern ist eher auf die höhere Konzentration des allergenen Materials zurückzuführen. Prick-Testlösungen sind 10- bis 100-fach stärker konzentriert als I.C.-Testlösungen.

In den Prick-Testlösungen wurden für die Firmen Allergopharma, HAL und Basotherm Werte unter 20 ng/ml gefunden. Die Meßergebnisse der anderen Firmen lagen alle unter 200 ng/ml. Die Ausnahmen waren Tropon-Goldhamster mit 376 ng/ml, Tropon-Ratte mit 842 ng/ml und Bencard-Katze mit 600 ng/ml.

Ein positiver Zusammenhang zwischen der Farbe und den gemessenen Fluoreszenzwerten ergab sich nicht, wie sich am Beispiel: Tropon-Katze: 197 ng/ml, farblos und Diephuis-Maser-Meerschweinchen: 50 ng/ml, dunkelbraun sehen läßt.

TABELLE 5

I.C. - Testlösungen
alle Einheiten sind in ng fluoreszierender Bestandteil / ml

<u>Hersteller</u>	<u>Hund</u>	<u>Katze</u>	<u>Kaninchen</u>	<u>Meerschweinchen</u>	<u>Goldhamster</u>	<u>Pferd</u>	<u>Ratte</u>	<u>Maus</u>
Hollister-Stier Tropon	9	60	6	4	8	3	15	7
Diephuis Maser	-	-	-	-	-	-	-	-
Allergo- pharma	-	-	-	-	-	-	-	-
HAL Düsseldorf	-	-	-	-	-	-	-	-
Bencard Beecham	-	-	-	-	-	-	-	-
Basochem	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELLE 6

PRICK - Testlösungen

alle Einheiten sind in ng fluoreszierender Bestandteil / ml

<u>Hersteller</u>	<u>Hund</u>	<u>Katze</u>	<u>Kaninchen</u>	<u>Meerschwein</u>	<u>Goldhamster</u>	<u>Pferd</u>	<u>Ratte</u>	<u>Maus</u>
Hollister-Stier Trapan	60	197	176	28	376	37	842	177
Diephuis Maser		24	39	50	39	49	62	62
Allergo- pharma	7	15	11	7	8	6	8	6
HAL	3	7	16	12	4	6	4	7
Basotherm	7	9	5	5	6	5		
Bencard Beecham	216	600	162	13	5	131	36	28

2. I.C.- und Prick-Histamin-Titration an freiwilligen Probanden

Um die gemessenen Werte, bei denen es sich wahrscheinlich um Histamin handelt, in ihrer klinischen Bedeutung einordnen zu können, wurde eine biologische Histamin-Titration an 10 freiwilligen Probanden durchgeführt, und zwar eine I.C.- und eine Prick-Titration. Die zugeführten Histaminmengen und die Größen der jeweiligen Reaktionen sind den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen.

Die I.C.-Titration wurde durchgeführt, indem jeweils 0.01 ml physiologische Kochsalzlösung mit einer bestimmten Konzentration an Histamin dem Probanden in die Rückenhaut gespritzt wurde. Die Anordnung der Einstichstellen wurde für jeden Probanden verändert, so daß eine eventuell vorhandene unterschiedliche Sensibilität der Rückenhaut keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben konnte. Es wurden Konzentrationen von 0.00001 mg Histamin/ml bis 0.1 mg Histamin/ml in Verdünnungsschritten von 1 : 10 injiziert.

Bei dieser I.C.-Titration ist bei 0.001 mg Histamin/ml ein auffallender Reaktionssprung: ab Verdünnung 0.0001 mg Histamin/ml zeigte sich bei allen Probanden keine Reaktion mehr. 0.0001 mg Histamin/ml entsprechen 100 ng/ml, so daß eine I.C.-Testlösung mehr als 100 ng Histamin/ml enthalten muß, um eine positive Hautreaktion am Probanden auszulösen. Alle untersuchten Lösungen hatten jedoch einen geringeren Histamin-Wert.

Die Größe des Quaddel- und des Erythemdurchmessers war der Histaminkonzentration proportional, ein Zusammenhang, den SWAIN (43) und SCHERR (34) bereits untersuchten.

Die Prick-Titration wurde an den Volarseiten der Unterarme der Probanden durchgeführt. Die Konzentration der aufgetropften Lösungen betrug zwischen 10 mg Histamin/ml und 0.0001 mg Histamin/ml, jeweils in Verdünnungsschritten von 1 : 10.

In der Prick-Titration wurde erst bei einer Histamin-Konzentration von 0.1 mg/ml eine positive Reaktion erkennbar, geringere Histamin-Konzentrationen waren nicht als positiv ablesbar. 0.1 mg Histamin/ml entsprechen einer Menge 100 000 ng Histamin/ml, einem Wert, der in den untersuchten Prick-Testlösungen bei weitem nicht gemessen wurde.

Selbst unter der Annahme, daß die gemessenen Fluoreszenzwerte, bei z.B. Tropon-Ratte mit 842 ng/ml, ausschließlich auf den Gehalt an Histamin zurückzuführen seien, wäre diese Konzentration zu gering, um für falsch positive Reaktionen verantwortlich zu sein.

Um dieses Ergebnis weiter zu erhärten, wurde die Tropon-Goldhamster-Prick-Testlösung (Fluoreszenz: 376 ng/ml) ebenfalls allen Probanden auf die Unterarmseite getropft. Keiner der Probanden zeigte dabei eine positive Reaktion.

TABELLE 7

I.C. - Titration

von Histamin auf der Rückenhaut von Probanden

Probanden	0.1 mg Histamin / ml	0.01 mg Histamin / ml	0.001 mg Histamin / ml	0.0001 mg Histamin / ml	0.00001 mg Histamin / ml	Leerwert
1	12-22-35	8-16-16	6-7-7	-	-	-
2	13-48-55	8-35-40	6-7-7	-	-	-
3	11-35-55	7-25-45	7-8-8	-	-	-
4	11-40-55	7-25-35	6-14-16	-	-	-
5	10-45-55	7-25-40	8-11-11	-	-	-
6	16-45-70	8-30-50	9-20-22	-	-	-
7	14-70-75	8-50-50	6-7-7	-	-	-
8	10-40-70	7-28-39	6-7-7	-	-	-
9	9-37-55	8-17-23	9-10-10	-	-	-
10	13-45-60	8-22-30	7-8-8	-	-	-
Summe	119-427-585	76-273-368	70-99-103			
Mittelwerte	12-43-59	8-27-37	7-10-10			

Die Meßwerte sind zu lesen als: Quadradeldurchmesser-kleinsten Erythredurchmesser-größter Erythredurchmesser
Die Einheit ist mm.

TABELLE 8

PRICK - Histamin - Titration

Probanden	10 mg Histamin/ml	1 mg Histamin/ml	0.5 mg Histamin/ml	0.1 mg Histamin/ml	0.01 mg Histamin/ml	0.001 mg Histamin/ml	0.0001 mg Histamin/ml	Leerwert	Goldhamster
1	6-30-33	6-24-28	3-16-16	-	-	-	-	-	-
2	11-35-60	8-18-20	7-28-30	-	-	-	-	-	-
3	7-25-37	4-8-10	3-8-8	-	-	-	-	-	-
4	9-20-80	5-20-25	4-16-17	-	-	-	-	-	-
5	10-25-25	6-9-10	4-5-5	-	-	-	-	-	-
6	8-25-25	5-18-20	3-9-10	-	-	-	-	-	-
7	10-23-26	6-26-26	6-12-12	-	-	-	-	-	-
8	12-22-35	6-12-19	3-10-10	-	-	-	-	-	-
9	11-27-30	6-24-28	3-7-7	-	-	-	-	-	-
10	8-35-50	5-30-30	3-18-18	-	-	-	-	-	-
Summe	92-267-411	57-189-216	39-129-133						
Mittel- werte	9-27-41	6-19-22	4-13-13						

Die Meßwerte sind zu lesen als: Quadrateidurchmesser - kleinster Erythrendurchmesser - größter Erythrendurchmesser
Die Einheit ist mm.

3. Gemessener Histamin-Gehalt der I.C.-Kontroll-Lösungen

T A B E L L E 9

I.C.-Kontroll-Lösungen

Hersteller	Leerwert- kontrolle ng/ml <u>gemessen</u>	Histamin- kontrolle ng/ml <u>gemessen</u>	Histamin auf dem Etikett deklariert
Hollister-Stier Tropon	-	0.1	0.01%=0.1 mg/ml
Diephuis Maser	-	0.1	0.005 mg/ml
Allergo- pharma	-	0.1	0.01%=0.1 mg/ml
Bencard Beecham	-	0.1	0.01%=0.1 mg/ml
Basotherm	-	0.1	0.01%=0.1 mg/ml
HAL	-	0.1	0.01%=0.1 mg/ml

Die Überprüfung der I.C.-Kontroll-Lösungen ergab keine fluoreszierenden Bestandteile in den Leerwert-Kontrollen aller Hersteller (Tabelle 9). Eine nahezu völlige Übereinstimmung der gemessenen Histamin-Konzentrationen der Positiv-Kontroll-Lösungen mit den angegebenen Histamin-Mengen überraschte und brachte noch einen Beweis für die Genauigkeit der Methode.

Bei dieser Untersuchung fiel auf, daß die verschiedenen Hersteller verschiedene Mengen Histamin in ihre Kontroll-lösungen einwiegen.

In einem Anschlußversuch wurden die Positiv-Kontrollen von zwei verschiedenen Herstellern bezüglich ihrer klinischen Auswirkung an 15 Patienten verglichen (Tabelle 10).

Die Quaddel- und Erythemdurchmesser von Allergopharma waren deutlich größer als die von Diephuis und an zwei Patienten war die Diephuis-Kontrolle sogar negativ.

TABELLE 10

I.C.-Histamin-Kontroll-Lösungen im Vergleich der klinischen Wirkungen

Quaddeldurchmesser		Allergopharma / Diephuis		Erythemdurchmesser (kleinster und größter Wert)		subjektive Beurteilung	
Allergopharma	Diephuis	Allergopharma	Diephuis	Allergopharma	Diephuis	Allergopharma	Diephuis
0,1 mg/ml Histamin / 0,005 mg/ml Histamin							
13	12	50-70	20			++	+(+)
10	10	35-45	20-30			++	+
13	10	20-35	15			+(+)	+
18	08	20-40	10			+	(+)
12	06	40-50	13-24			++	+
11	08	32-34	15			+	(+)
09	06	25-40	20-30			++	+(+)
10	09	40	30			+(+)	(+)
09	08	23-32	12			+(+)	(+)
20	10	55	45			++	+(+)
10	05	30-40	25			+(+)	+
09	07	24-40	13			+	(+)
15	10	20-40	-			+(+)	-
10	-	31-40	-			+	-
10	08	35-45	28			+(+)	+
Summen	117	481-656	266-297				
Mittelwerte	11	32-44	18-20			+(+)	+

Alle Werte sind in mm.

4. Gemessener Histamin-Gehalt der Prick-Kontroll-Lösungen

TABELLE 11

Prick - Kontroll - Lösungen

Hersteller	Leerwert-kontrolle ng/ml gemessen	Histamin-kontrolle ng/ml gemessen	Histamin auf dem Etikett deklariert
Hollister-Stier Tropon	-	10	1 % = 10 mg/ml
Diephuis Maser	-	0.5	0.05 % = 0.5 mg/ml
Allergo- pharma	8	1	0.1 % = 1 mg/ml
HAL Düsseldorf	3	10	1 % = 10 mg/ml
Bencard Beecham	11	1	0.1 % = 1 mg/ml
Basotherm	4	1	0.1 % = 1 mg/ml

Bei den Ergebnissen der Untersuchung der Prick-Kontroll-Lösungen fiel auf, daß die Leerwert-Kontrollen Fluoreszenzwerte bis zu 11 ng/ml enthielten (Tabelle 11).

11 ng Histamin/ml in der Prick-Lösung sind jedoch so wenig, daß sie vernachlässigt werden können und die Prick-Kontroll-Lösungen als Histaminfrei betrachtet werden können. In den Histamin-Kontroll-Lösungen stimmte die gemessene Histamin-Konzentration mit der angegebenen überein. Vergleicht man die Histamin-Kontrollen der Firmen untereinander, so sind die Histamineinwaagen doch sehr unterschiedlich und differieren um den Faktor 20.

TABELLE 12

PRICK - Histamin-Kontroll-Lösungen im Vergleich

	Tropon 10 mg/ml 1 %	Allergopharma 1 mg/ml 0,1 %	Diephuis 0.5 mg/ml 0.05 %
	6-30-33	4-25-28	3-16-16
	11-35-60	8-20-24	7-28-30
	7-25-37	4-14-15	3-8-8
	9-20-80	6-18-20	4-16-17
	10-25-25	5-14-16	4-5-5
	8-25-35	5-22-27	3-9-10
	10-23-26	7-12-14	6-12-12
	12-22-35	5-11-14	3-10-10
	11-27-30	4-17-18	3-7-7
	8-35-50	4-30-35	3-18-18
Summe	92-267-411	52-183-212	39-129-133
Mittel- wert	9-27-41	5-18-21	4-13-13

Die Werte sind zu lesen als:

Quaddeldurchmesser - kleinster Erythemdurchmesser

- größter Erythemdurchmesser

Die Einheit ist mm.

Ein anschließender klinischer Vergleich (Tabelle 12) dreier verschiedener Firmen, hier wurden die Firmen mit der höchsten, der niedrigsten und einer mittleren Histaminkonzentration in der Kontroll-Lösung gewählt. ergibt deutlich unterschiedliche Werte für Quaddel- und Erythemdurchmesser.

V. Diskussion der Ergebnisse

1. Vergleichbarkeit der Allergenextrakte

Sieht man von der Schwierigkeit der Vergleichbarkeit der Stärke von Allergenextrakten ab, so sollten die Hersteller sich doch wenigstens auf eine einheitliche Beschriftung der Extraktflaschen einigen.

Bei den verschiedenen Tier-Epithelien-Extrakten, die untersucht wurden, variierten die Angaben nicht bloß von Hersteller zu Hersteller, sondern etikettierte auch ein und derselbe Hersteller seine Extrakte unterschiedlich für Prick- und I.C.-Tests. (Tropon, Allergopharma)

Ein Hersteller wechselt seine Inhaltsangabe sogar innerhalb der Prick-Testlösung (Tropon: G/V und PNU/ml).

Auch wenn aus einer einheitlichen Inhaltsangabe, die vielleicht in mg/ml oder PNU/ml nur Angaben über das Verhältnis der Einwaage des Ausgangsmaterials (hier: Tierepithelien) zur Extraktionsflüssigkeit machen würde, keine Aussage über die Stärke der Testlösung hervorginge, wäre doch etwas mehr Klarheit beim Untersucher zu seinem Untersuchungsmaterial hergestellt.

An den Angaben eines Herstellers von 150 % und 6 % (Bencard: Hund-Prick-Testlösung und Maus-Prick-Testlösung) innerhalb von Tierepithelien-Prick-Testlösungen wird jeoch auch die Allergen-Mengenangabe zur Farce. 6 g Mausepithelien oder 150 g Hundeepithelien in 100 g Extraktionsflüssigkeit liefern also Prick-Testlösungen mit - hoffentlich - gleicher Allergenaktivität.

Eher als eine einheitliche Inhaltsangabe in G/V oder PNU/ml sollte also die Bestimmung der allergen Potenz oder Allergenaktivität und deren Deklaration auf dem Etikett erfolgen.

Vorschläge zur Vereinheitlichung von Inhaltsangaben gibt es z.B. von FISCHER und SCHMUTZLER (12) und, für die skandinavischen Länder, von AAS (3).

FISCHER und SCHMUTZLER entwickelten den Referenz Allergen Bioassay (RABS), eine Methode der biologischen Standardisierung von Allergenextrakten. Die Methode basiert auf einer Histaminliberation aus Meerschweinchen-Mastzellen: die untersuchten Allergenextrakte werden zu einem Referenzallergen (HSA = Human-Serum-Albumin) verglichen. Diese Methode erlaubt die Einstellung von Allergenextrakten auf allergene Potenzen, so daß die Vergleichbarkeit von Produkten verschiedener Hersteller möglich wird.

Auch die von AAS beschriebene Methode der Vergleichbarkeit von Allergenextrakten ist eine biologische: dem skandinavischen Allergen-Referenzsystem (SARS) liegen Hautteste (Prick) am Menschen zugrunde.

Hier wird die Stärke der Reaktion auf Allergenextrakte bei Allergikern mit der Größe der Reaktion auf Histamin verglichen.

Die Aktivität eines Allergenextraktes kann dann in HEP (Histamin Equivalent Prick = gleichwertig mit Histamin beim Pricktest) angegeben werden und wird somit nur auf seine Wirkung beurteilt und ist somit vergleichbar.

2. Mindestgehalt von Histamin in Histamin-Kontroll-Lösungen

Die Uneinheitlichkeit der Deklaration von Allergenextrakten setzt sich in der Uneinheitlichkeit der Stärke der Histaminkontrollen der verschiedenen Hersteller fort.

So variieren die Stärken für I.C.-Kontrollen von 0.005 mg Histamin/ml bis 0.01 % (= 0.1 mg/ml), also um den Faktor 20.

SWAIN und BECKER (43), die sich mit der Größe der Reaktion auf Histamin je nach Injektionsort beschäftigten, haben für ihre I.C.-Teste eine Konzentration von 0.1 mg Histamin/ml (0.01 %) gewählt, während M.SCHERR die Reaktion auf 0.01 mg Histamin/ml (= 0.001 %) an einer Vielzahl von Patienten über zwei Jahre beobachtete (34). Beide Untersucher erhielten gut ablesbare Ergebnisse.

Eine 0.01 %ige (0.1 mg Histamin/ml) I.C.-Kontroll-Lösung scheint nach den Titrationsergebnissen optimal zu sein, allerdings ist auch eine 0.001 %ige (0.01 mg/ml) Lösung noch ausreichend. Da aber genau hier zur nächsten zehnfach-Verdünnung der Reaktionsprung liegt (bei 0.001 mg/ml erhält man keine Hautreaktion mehr), und die Reaktion auf Histamin sehr variabel ist (SCHERR maß einen Quaddeldurchmesser von 6.4 ± 2.4 cm auf 0.01 mg Histamin/ml), ist die 0.005 mg Histamin/ml enthaltende Kontrolle von Diephuis zu schwach konzentriert.

In 2 von 15 Probanden konnte mit der 0.005 mg/ml Histamin-Kontrolle keine Hautreaktion mehr hervorgerufen werden, d.h. es muß zwangsläufig eine Fehlinterpretation des Hauttests erfolgen, da diese stets auf die Kontrollreaktion bezogen wird.

Auch die Prick-Kontroll-Lösungen variieren um den Faktor 20: die deklarierten Histamin-Mengen betragen 0.05 % (= 0.5 mg/ml) bei Diephuis, 0.1 % (= 1 mg/ml) bei Allergopharma, Bencard und Basotherm und 10 % (= 10 mg/ml) bei HAL und Tropon.

In seinen Recommendations for biological Quality testing and Standardization schlägt AAS eine Histaminkonzentration von 1 mg/ml oder 10 mg/ml bei Pricktesten als Vergleichslösung vor (2).

Obwohl mit 0.5 mg Histamin/ml bei allen Probanden noch eine positive Reaktion ablesbar war, sollte doch auch hier eine Vereinheitlichung stattfinden und ein Wert von 1 mg Histamin/ml als Prick-Kontroll-Lösung allgemein akzeptiert und auch hergestellt werden.

3. Die Möglichkeit von falsch positiven Hauttestreaktionen

In den untersuchten Testlösungen konnten größtenteils keine fluoreszierenden Bestandteile nachgewiesen werden, d.h. es lag keine Histaminverunreinigung vor. Einige Lösungen enthielten jedoch fluoreszierende Bestandteile bis zu Werten von 840 ng/ml bei Prick-Lösungen und 60 ng/ml bei I.C.-Lösungen.

Die durchgeführte Histamintitration für Prick- und I.C.-Tests zeigte allerdings, daß - selbst wenn diese Bestandteile reines Histamin sein sollten - sie keine klinische Relevanz hätten, da erst Werte von mehr als 1000 ng/ml bei I.C.- und mehr als 100 000 ng/ml bei Prick-Tests eine positive Reaktion hervorrufen würden.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die beobachteten Positivreaktionen bei Hauttests bei den untersuchten Tierepitheltestlösungen nicht auf deren Verunreinigung durch Histamin beruhen.

Welche anderen Möglichkeiten bleiben also zur Erklärung von Positivreaktionen bei Hauttests? Die Möglichkeit der bakteriellen Verunreinigung und damit möglicherweise die Reaktion auf gebildetes Endotoxin oder Stoffwechselprodukte wurde untersucht. Hierzu wurden die 3 Prick-Testlösungen mit den höchsten Fluoreszenzwerten: Tropon-Ratte, Tropon Goldhamster und Bencard-Katze jeweils auf Kochblut-Agar, Frischblut-Agar und Müller-Hinton-Agar ausgestrichen und 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

Nach 24 und nach 48 Stunden wurde abgelesen und es konnte auf allen Nährböden kein bakterielles Wachstum festgestellt werden, obwohl die Testlösungen schon acht Wochen geöffnet im Kühlschrank standen.

Sind also nicht bakterielle Endotoxine die Ursache einer Positivreaktion, stellt sich die Frage nach anderen möglichen Endotoxinen oder Verunreinigungen. SIRAGANIAN et al. sind dieser Frage nachgegangen und untersuchten Hausstaubextrakte von 8 verschiedenen Herstellern. Es wurden wenigstens zwei Chargen von jedem Hersteller auf ihren Gehalt an Endotoxinen überprüft und dabei der Kaninchen Pyrogenitäts-Assay und der Limulus lysate-Assay verwendet. In allen Extrakten konnte dabei Endotoxin nachgewiesen werden, allerdings gab es große Unterschiede zwischen den einzelnen Herstellern. Die Limulus lysate-Aktivität schwankte von 450 ng/ml Endotoxin-Äquivalent bis 500 000 ng/ml.

Eine Korrelation des Endotoxingehalts mit dem PNU-Gehalt der Extrakte ergab sich nicht (39). HAMMOND und ROOKE (18) dagegen haben bei der Untersuchung von 214 Dose Glycerinextrakten nur einen "verunreinigten" Extrakt gefunden. Die Glycerinextrakte wurden 1:10 verdünnt und mit Hilfe des Intradermalen Empfindlichkeitstests am Meerschweinchen auf die Verursachung von unspezifischen Hautreaktionen untersucht. Nur einer der Extrakte, eine Federnmischung, zeigte dabei eine positive Reaktion. An 10 freiwilligen Probanden wurde dieser Extrakt noch weiter getestet und rief bei 4 von ihnen ebenfalls eine positive Reaktion hervor.

In weiteren Meerschweinchen-Untersuchungen konnte bestätigt werden, was GUERIN und TIOULON (15) bereits für Ratten berichteten, nämlich daß Merthiolat, Glycerin und Phenol in der Haut Mediatoren freisetzen können und somit ihre zu hohe Konzentration in den Allergenextrakten der Grund für unspezifisch positive Hautreaktionen ist.

In dem Rattenmodell wurden maximale Konzentrationen für diese Substanzen festgesetzt, und zwar in Höhe von 0.01 g/l Merthiolat, 3 % v/v Glycerin und 0.4 % Phenol für I.C.-Testlösungen.

AAS weist in diesem Zusammenhang immer auf "Irritantien" hin, denen er die Verursachung von falsch positiven Reaktionen zuschreibt. Sie seien schon deshalb besonders zu berücksichtigen, weil - wie er sagt - Allergiker auf niedrigerere Konzentrationen von unspezifischen Irritantien reagieren als Normalpersonen. Deshalb schlägt er auch Hauttests für die Überprüfung der Reinheit von allergenen Lösungen vor, die an empfindlichen Personen, d.h. an Allergikern, durchgeführt werden sollten (1).

Als Irritantien nennt er: "verschiedene Proteine, andere, Aminogruppen-enhaltene Komponenten. Kohlenhydrate, kaum definierte Substanzen, Histamin, Endotoxine und Substanzen, die Histamin freisetzen können" (1), ebenso wie Bestandteile, die Enzymsysteme in Gang setzen, die bei Entzündungsvorgängen bedeutend sind, z.B. Plasma-Chinin. Als Konsequenz fordert er für die Allergie-Tests Extrakte, die frei von Irritantien sind; und da die meisten dieser Irritantien zu den Substanzen mit relativ geringem Molekulargewicht gehören, würde es methodisch verhältnismäßig einfach sein, sie von den allergenen Proteinmolekülen zu trennen (3).

Es bleibt noch die Möglichkeit, die Positiv-Reaktion nicht nur auf das Allergen zurückzuführen, sondern auch auf die Testperson. Zum einen gibt es verschieden empfindliche Körperstellen (43), zum anderen können Emotionen, vasomotorische Instabilität oder Infektionen die Reaktion beeinflussen (31).

Unter der Voraussetzung, daß die Technik und das Untersuchungsmaterial zufriedenstellend sind, seien positive Reaktionen immunologisch spezifisch, sagt PEPYS. Gibt es keine Klinik zur positiven Reaktion, so wird sie als latent oder sub-klinisch bezeichnet. Dazu wird eine Untersuchung von CHAMBERS und GLASER von 1958 (31) zitiert, nach der die Hälfte der auf Pollen positiv reagierenden Personen ohne Pollinosis innerhalb der nächsten 5 Jahre eine Pollinosis entwickelten.

Des weiteren weist PEPYS auf die Möglichkeit von Kreuzreaktionen hin. Er zählt hierbei die Kreuz-Reaktion bei Parasiten-Erkrankungen auf, ebenso wie die Kreuz-Reaktion auf Extrakte von Nematoden, Trematoden und Cestoden bei Patienten mit allergischer pulmonaler Aspergillose.

Ganz allgemein behauptet er, der I.C.-Test gäbe mehr unspezifische Reaktionen als der Pricktest, da er traumatisierend sei und aus technischen Gründen schon unspezifische Reaktionen ergibt, die man als positiv ablesen könnte (31).

Wir haben es also mit einer Vielzahl von Erklärungsversuchen für die vermuteten falsch positiven Reaktionen zu tun und es bleibt an dieser Stelle die nochmalige Forderung nach besserer Reinigung der Extrakte

und einer Standardisierung, die sich auf die allergene Potenz des Untersuchungsmaterials und nicht der bloßen Angabe von Einwaage zur Extraktionsflüssigkeit stützt.

VI. Zusammenfassung

Die zur Diagnostik von Typ-I-Allergien verwendeten Prick- und I.C.-Testlösungen, die von der Industrie fertig angeboten werden, zeigen in der klinischen Praxis häufiger falsch positive Reaktionen. Da diese Reaktionen durch Verunreinigungen, z.B. mit Histamin hervorgerufen sein könnten, wurde eine Anzahl der Allergenextrakte auf ihren eventuellen Histamingehalt überprüft. Dazu wurden 95 Tierepithel-Testlösungen von 6 verschiedenen Herstellern untersucht. Das Histamin wurde mit Hilfe eines Autoanalyzers nach der Methode von SHORE und ihrer Weiterentwicklung nach SIRAGANIAN bestimmt.

In den untersuchten Testlösungen konnten größtenteils keine fluoreszierenden Bestandteile nachgewiesen werden, d.h. es lag keine Histaminverunreinigung vor. Einige Lösungen enthielten jedoch fluoreszierende Bestandteile bis zu Werten von 840 ng/ml bei Prick-Lösungen und 60 ng/ml bei I.C.-Lösungen. Um die gefundenen Werte klinisch einordnen zu können, wurden je eine Prick- und eine I.C.-Histamin-Titration an 10 freiwilligen Probanden durchgeführt. Die Titration ergab, daß die in den Allergenextrakten nachgewiesenen Histaminmengen zu gering waren, um für falsch positive Reaktionen verantwortlich zu sein.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die beobachteten Positivreaktionen bei Hauttests bei den untersuchten Tierepitheltestlösungen nicht auf deren Verunreinigung durch Histamin beruhen.

VIII. Literatur

1. AAS, K.
Clinical and Experimental Aspects of
Standardization and Purification of
Allergen
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 49;
44-54 (1975)
2. AAS, K., L.BELIN
Standardization of Diagnostic Work
in Allergy
Northern Society of Allergology
Acta Allergologica 27; 439-468 (1972)
3. AAS, K.
Allergenextrakte - Allgemeine Betrachtungen in: K. Aas, H.D. Brede (Hrsg.)
"Allergen-Extrakte",
Fischer, Stuttgart 1979
4. AAS, K.
The biochemical and immunological basis
of bronchial asthma
Ch. C. Thomas, Springfield 1972
5. AAS, K.
The bronchial provocation test
Ch.C. Thomas, Springfield 1974

6. ARBESMAN, C.E., J.I. WYPICH, R.E. REISMAN
Evaluation of RAST Inhibition as a Method
for Standardization of Ragweed Pollen
Extracts
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 53;
310-318 (1977)
7. BEAVEN, M.A., A. ROBINSON-WHITE, N.B. RODERICK,
G.L. KAUFFMAN
The Demonstration of Histamine Release in
Clinical Conditions:
A Review of Past and Present Assay Procedures
Klin. Wochenschr. 60; 873-881 (1982)
8. BERRENS, L.
Plural Actions of Allergens. A Problem in
Purification and Standardization
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 49;
63-73 (1975)
9. BORK, K., W. KÖNIG
Neue In-vitro-Methodik in der Allergologie:
Histamin-Release-Test
Dtsch. med. Wschr. 106; 1060-1064 (1981)
10. BRUCE, C., R. WEATHERSTONE, A. SEATON,
W.H. TAYLOR
Histamine Levels in Plasma, Blood, and Urine
in Severe Asthma, and the Effect of Corti-
costeroid Treatment
Thorax 31; 724 (1976)

13. KENNEDY, R.
Introduction to Econometrics
H. Holt, Rinehart and Winston
New York, New York, 1985.
14. KENNEDY, P. & LUTTEGGER
1983 - *Statistical Theory and Econometrics*
Academic Press, New York, New York.
1983 - *Statistical Theory and Econometrics*
Academic Press, New York, New York.
1983 - *Statistical Theory and Econometrics*
Academic Press, New York, New York.
15. KENNEDY, P. & LUTTEGGER
Statistical Theory and Econometrics
Academic Press, New York, New York.
1983 - *Statistical Theory and Econometrics*
Academic Press, New York, New York.
16. KENNEDY, P.
Statistical Theory and Econometrics
Academic Press, New York, New York.
1983 - *Statistical Theory and Econometrics*
Academic Press, New York, New York.
17. KENNEDY, P. & LUTTEGGER
Statistical Theory and Econometrics
Academic Press, New York, New York.
1983 - *Statistical Theory and Econometrics*
Academic Press, New York, New York.

16. GUILLOUX, L., D. HARTMANN, G. VILLE
Enzymatic isotopic assay for human
plasma histamine
Clinica Chimica Acta, 116; 269-275 (1981)
17. HABERMANN, E.
Bee and wasp venoms.
Science 177; 314 (1972)
18. HAMMOND, M.D., M.B. ROOKE
Intradermaler Empfindlichkeitstest am
Meerschweinchen und die Häufigkeit un-
spezifischer Hautreaktionen in Aller-
genextrakten
Allergologie, 7; 30-33 (1/1984)
19. ISHIZAKA, K., T. ISHIZAKA
Mechanisms of Reaginic Hypersensitivity
and Immunotherapy
Lung, 155; 3-22 (1978)
20. KALLOS, P., H.D. SCHLUMBERGER
Allergie und allergische Krankheiten
Medizin von heute, 26
TROPON WERKE 1978

21. KEYZER, J.J., H.BREUKELMAN, H.ELZINGA,
B.J.KOOPMAN, B.C.WOLTHERS, A.P.BRUIJS
Determination of Histamine by Chemical
Ionization
Mass Spectrometry: Application to Human
Urine
Biomedical Mass Spectrometry, 10; No. 8,
480-484 (1983)
22. KEYZER, J.J., J.G.R.deMONCHY,
J.J.vanDOORMAAL, P.C.vanVOORST VADER
Improved Diagnosis of Mastocytosis by
Measurement of Urinary Histamine Metabolites
New Engl. J. of Med., 309; 1603-1605 (1983)
23. KHANDELWAL, J.K., L.B. HOUGH, J.P.GREEN
Histamine and Some of its Metabolites
in Human Body Fluids
Klin. Wochenschr. 60; 914-918 (1982)
24. KLEINE-TEBBE, J.
Histamin-Freisetzung aus basophilen Leu-
kozyten von Patienten mit Inhalations-
allergien gegen den Käfer *Trogoderma*
angustum. Unveröffentlichte Dissertation
25. KÖNIG, W.
Die immunbiologische Rolle des Histamins
und seine Bedeutung für die Allergie-
diagnostik
Immunität und Infektion 1; 38-46 (1978)

26. LICHTENSTEIN, L.M., T.P.KING, A.G.OSLER
In vitro assay of allergenic properties
of ragweed pollen antigens
J.Allergy, 28; 174-182 (1966)
27. LÖWENSTEIN, H.
Quantitative Immuno-electrophoretic
Methods as a Tool for the Analysis and
Isolation of Allergens
Prog. Allergy, 25; 1-62 (1978)
28. MAY, S.
Characterization of allergenic extracts
by the histamine release method in the
blood of allergic individuals
Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut,
Heft 78
Gustav Fischer Verlag Stuttgart,
New York, 119-124 (1983)
29. NOON, L., B.C.CANTAB., F.R.C.S.ENG.
Prophylactic Inoculation against Hay Fever
Lancet I, 1572-1573 (1911)
30. NORMAN, P.S., L.M.LICHTENSTEIN, K.ISHIZAKA
Diagnostic tests in ragweed hay fever
J. Allergy Clin. Immunol., 52; 210-224 (1973)

31. PEPYS, J.
Skin Tests in diagnosis.
In: P.G.H. Gell, R.R.A.Coombs,
P.J.Lachmann (Edts.) "Clinical Aspects
of Immunology"
Blackwell Oxford, 3rd Edition, (1975)
32. PRAUSNITZ,C., H.KÜSTNER
Studien über die Überempfindlichkeit
Centralbl. f. Bakt. Parasit. u. Infekt.,
Abt. Originale, 86; 160-169, (1921)
33. SCHADEWALDT,H.
Geschichte der Allergie in vier Bänden
Dustri, München-Deisenhofen, 1980
34. SCHERR, M.S., W.C.GRATER, H.BAER,
B.A.BERMAN
Report of the Committee on Standardization:
A Method of Evaluating Skin Test Response
Annals of Allergy, 29; 30-34 (1971)
35. SHELLEY,W.B., L.JUHLIN
Histamine Chromatography and
Electrophoresis
Journal of Chromatography, 22;
130-138 (1966)

36. SHORE, P.A., A. BURKHALTER, V.H. COHN
A method for the fluorometric assay
of histamine in tissues
J. Pharmacol. Exp. Ther. 127;
182-186 (1959)
37. SIEFERT, G.
Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt/Main
persönliche Mitteilung vom 23.12.1983
38. SIRAGANIAN, R.P.
An Automated Continuous-Flow System
for the Extraction and Fluorometric
Analysis of Histamine
Analytical Biochemistry 57;
383-394 (1974)
39. SIRAGANIAN, R.P., H. BAER, H.D. HOCHSTEIN,
J.C. MAY
Allergenic and biologic activity of
commercial preparations of house dust
extracts
J. Allergy Clin. Immunol., 64;
526-533 (1979)
40. SNYDER, S.H., R.J. BALDESSARINI,
J. AXELROD
A sensitive and specific enzymatic
isotopic assay for tissue histamine
J. Pharmacol. Exp. Therapeutics, 153;
544-549 (1966)

41. STAHL, E. (Hrsg.)
Dünnschicht-Chromatographie
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg,
New York 1967
42. STRUYKEN, J.
Wertbestimmung von Histamin
Nederl. Tijdschr. Geneesk. II
56-45 (1931)
43. SWAIN, H.H., E.L. BECKER,
Quantitative Studies in skin testing
J. Allergy, 23; 441-451 (1952)
44. WAHL, MAASCH et.al. Allergopharma
persönliche Mitteilung
45. WAHN, U.
Möglichkeiten und Grenzen der
allergeninduzierten Histamin-
freisetzung aus Leukozyten als
In-vitro-Technik für die Allergologie
Allergologie, 3; 364-368 (1980)

46. WAHN, U., R.P. SIRAGANIAN
Efficacy and specificity of
immunotherapy with laboratory
animal allergen extracts
J. Allergy Clin. Immunol., 65;
413-421 (1980)
47. YMAN, L.
Allergen Assay and Extract Potency
Estimation
Transact. Colleg. int. Allerg. 10th Symp.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 49;
55-62 (1975)

LEBENS LAUF

5. 4.1952 geboren in Berlin-Charlottenburg
als Tochter des Steuerberaters
Willi Lübcke und seiner Ehefrau
Ingeborg,
2 jüngere Schwestern

1. 4.1958 10. Grundschule in Berlin-Wilmersdorf

1. 4.1964 Marie-Curie-Oberschule,
mathematisch-naturwiss. Zweig

1967/68 Austauschschülerin in New Jersey, USA

15. 1.1971 Abitur

16.1.71-31.3.71 Angestellte im Fernmeldeamt I

1.4.71-31.3.72 Pädagogikstudium an der TU Berlin

1.4.72-20.9.74 Ausbildung als Chem.-Biolog.Assistentin
am Lette-Verein, Berlin

27. 9.74 Staatsexamen als Chem.-Biologische
Assistentin

1.4.74-2.12.81 Medizinstudium an der FU Berlin

1980/81 Praktisches Jahr:

Innere Medizin: Schloßparkklinik

Chirurgie: Krankenhaus am Urban

Psychiatrie: Karl-Bonhoeffer-
Heilstätten

11. 1.1982 Approbation als Arzt

1.5.82- 31.4.83 Laborärztin im Landesmedizinal-
untersuchungsamt Berlin

1.10.1983 Laborärztin im Rufbereitschafts-
dienst der Blutbank im Krankenhaus
Moabit

Ich danke

der Crew der Asthma-Poliklinik
vor allem Herrn Professor Kunkel

und Zappa,

ohne dessen freundliche Tritte diese
Arbeit nie geschrieben worden wäre
und Herrn Dr. Käfer

"for his excellent photographic work"

und Frau Wirth und Herrn Günther Hähnel,
deren Hilfe mir nicht nur die Seite 19
ermöglichte.

Danke

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen